






学位論文審査の結果及び学力の確認の結果の要旨

学位申請者氏名	餅田 愛	
学位論文名	マウス破骨細胞の分化・骨吸収機能に対する抗 Siglec-15 抗体の効果 (Effect of anti-Siglec-15 antibody on mouse osteoclast differentiation and bone resorbing function)	
論文審査委員	主査：	松本歯科大学 教授 平岡行博 
	副査：	松本歯科大学 教授 内田啓一 
	副査：	松本歯科大学 教授 十川紀夫 
	副査：	
	副査：	
学力の確認	実施年月日	2020 年 1 月 10 日
	試験方法	⓪答 ・ 筆答
学位論文の要旨		
<p>【目的】 骨組織においては、破骨細胞による骨の吸収と骨芽細胞による骨の形成が絶え間なく繰り返されている。この骨吸収と骨形成のカップリングにより、力学的なストレスに耐えられる弾力性を有する新しい骨組織が形成される。近年、分子レベルで骨吸収と骨形成に関する研究が進み、さまざまなホルモン、サイトカイン、転写因子の作用機構の詳細が明らかとされ、骨カップリング制御機構を説明するための重要な実験結果が蓄積してきた。Immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) は、T 細胞や B 細胞の受容体と会合する細胞膜アダプター分子の細胞内ドメインに共通してみられるモチーフとして発見された。ITAM 配列を有する DNAX-activating protein 12 (DAP12) と Fc receptor common γ subunit (FcRγ) は、破骨細胞において発現が高い。DAP12 と FcRγ のダブル欠損マウスは骨吸収不全を呈する大理石骨病を惹起する。最近、DAP12 と会合する免疫グロブリンスーパーファミリー分子として、シアル酸受容体タンパク質である Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin 15 (Siglec-15) が同定された。Siglec-15 は破骨細胞の分化に伴って誘導され、Siglec-15 遺伝子欠損マウスは骨吸収が抑制され骨量が増加するが、破骨細胞数はほとんど減少しない。また、骨形成に対しては、骨形態計測の結果から、骨芽細胞数や骨形成速度などの骨形成パラメーターが野生型正常マウスと比べ、ほとんど差が無いと報告されている。この実験結果は、破骨細胞の存在が骨芽細胞の活性を支え、骨吸収と骨形成がカップリングしていることを示唆している。本研究においては、Siglec-15 の作用を中和する抗 Siglec-15 抗体の効果について、マウス由来の細胞培養系において検討した。</p> <p>【結果】 抗 Siglec-15 抗体は、マウス骨髄細胞培養系に RANKL と M-CSF を添加し 3 日間で破骨細胞が誘導される条件で、酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ (TRAP) 陽性の多核破骨細胞の分化を阻害した。この時、TRAP 陽性の単核破骨細胞は多数残存していた。骨髄細胞を長期 (約 2 週間) にわたり培養する系において、抗 Siglec-15 抗体は、TRAP 陽性の多核破骨細胞の分化を阻害すると共に、M-CSF と RANKL の存在下でアルカリホスファターゼ (ALP) 陽性の骨芽細胞を多数誘導した。抗 Siglec-15 抗体の代わりに、RANKL のデコイ受容体であるオステオプロテゲリンを添加しても、ALP 陽性の骨芽細胞の誘導は認められなかった。長期骨髄細胞培養系においても、抗 Siglec-15 抗体は多核破骨細胞形成を抑制するが、単核 TRAP 陽性破骨細胞は多数残存していた。骨芽細胞と骨髄細胞の共存培養系において、RANK 陽性および c-Fms 陽性の破骨細胞前駆細胞 (qOP) が出現する。抗 Siglec-15 抗体は qOP の形成に対して抑制効果を示さなかった。</p>		

(様式第 15 号)

成熟破骨細胞の機能に対する抗 Siglec-15 抗体の効果を解析した。抗 Siglec-15 抗体の 2 時間処理は、破骨細胞の象牙切片上におけるアクチンリング形成を阻害した。また、象牙切片上の吸収窩形成も抗 Siglec-15 抗体の 2 日間処理により強く阻害された。

最近、骨細胞の特異形質であるスクレロスチンは、骨形成を阻害する作用を有し、骨形成を制御する因子として重要な役割を果たしていることが明らかとされた。また、破骨細胞の培養上清は、骨肉腫由来細胞である UMR106 細胞に発現するスクレロスチンの発現を阻害することが報告されている。そこで、破骨細胞に抗 Siglec-15 抗体を処理し、その培養上清の UMR106 細胞におけるスクレロスチン発現に対する効果を解析した。その結果、抗 Siglec-15 抗体の処理の有無に拘らず、UMR106 細胞におけるスクレロスチン発現は阻害された。前述の実験系における破骨細胞由来のスクレロスチン発現抑制因子は、Leukemia inhibitory factor (LIF: 白血病阻害因子) であることが明らかとされている。そこで、LIF を含む破骨細胞の特異形質発現に対する抗 Siglec-15 抗体の効果について検討した。成熟破骨細胞に抗 Siglec-15 抗体を処理しても、カテプシン K および RANK の発現維持と同様に、LIF 発現も維持されていた。

【結論】

抗 Siglec-15 抗体は多核破骨細胞の分化と骨吸収機能を阻害すると共に骨芽細胞の分化を促進する可能性が考えられる。

学位論文審査結果の要旨

本研究は、Siglec-15 の作用を中和する抗 Siglec-15 抗体の効果について、マウス由来の細胞培養系において検討したものである。抗 Siglec-15 抗体は、破骨細胞の分化抑制に対して、多核破骨細胞形成はほぼ完全に阻害するが、単核破骨細胞は残存する。また、破骨細胞による骨吸収活性（吸収窩形成）に対しても、抗 Siglec-15 抗体は、ビスホスホネートとは違い、完全阻害を示さない。抗 Siglec-15 抗体を投与した動物実験においても、骨吸収阻害作用について同様の結果である。このマイルドな骨吸収阻害作用こそ、骨粗鬆症治療薬としての優位な効果につながると考えている。

本論文は本学大学院歯学独立研究科硬組織疾患制御再建学専攻の学位論文として、基礎歯科医学のみならず、将来的に臨床分野への応用につながる可能性を含んだ意義のある研究であると評価した。以上のことより、本論文に学位論文としての価値を認めた

学力の確認の結果の要旨

学位申請論文を中心に口頭による試験を行った。主要な質問事項は次のとおりである。

- 1 今後、中和抗体を用いた in vivo 実験を行うとすると、どんな方法を考えるか。
- 2 RANKL のリバースシグナルとはどのようなメカニズムか。
- 3 細胞培養系と動物実験での Siglec-15 の作用の違いを説明するための特殊性とは何か。
- 4 骨粗鬆症治療薬として応用する場合の主な効果と副作用などについて。
- 5 単核破骨細胞と多核破骨細胞の機能の違いについて。

以上の質問および示唆に対して、申請者は適切な回答を行った。また、申請者は実験より得られた結果に対して適切な考察が行える専門知識があり、博士課程修了者として十分な知識と学力を有しているものと判断された。本審査委員会は、申請者を博士（歯学）として十分な学識を有するものと認定、最終試験合格との結論に至った。

判定結果 合格 ・ 不合格

備考

- 1 学位論文名が外国語で表示されている場合には、日本語訳を（ ）を付して記入すること。
- 2 学位論文名が日本語で表示されている場合には、英語訳を（ ）を付して記入すること。
- 3 論文審査委員名の前に、所属機関・職名を記入すること。